

普通番茄叶肉原生质体和多毛番茄 茎尖原生质体的电融合

刘克斌 李曙轩

余海 胡汛 郭一舒

(浙江农业大学园艺系, 杭州 310029)

(浙江医科大学肿瘤研究所, 杭州 310031)

提 要 普通番茄叶肉原生质体和多毛番茄茎尖原生质体在一交变电场中(正弦波; 1mHz, 200V/cm)可发生双向电泳而随机排列成串。再附加单个直流方波脉冲, 可诱导相邻原生质体的融合, 适宜的融合脉宽为 40 μ s, 电压幅度为 3000V/cm。最高融合率可达 57%。培养经电融合处理的原生质体, 观察到了少数原生质体的第1次分裂。

关键词 番茄; 原生质体; 电融合

体细胞杂交的成功取决于适宜的原生质体融合技术, 理想的融合技术应该包括通过1个简单的方法可以得到大量的二核异源融合体^[3], PEG是一种应用最为广泛的诱导融合剂, 但PEG诱导的随机融合的频率在大多数报道中一般仅1—10%^[4]。通过增加PEG浓度可以增加融合频率^[4], 但这往往导致细胞活性下降^[5]。实际上, 已有报道表明, PEG对一些种的叶肉原生质体和分离的细胞器的毒性相当高^[6]。因此, 近几年来正在寻找新的融合途径^[1, 4]。Zimmermann等人(1987)根据双向电泳现象^[13], 改进Senda等(1979)的电融合技术^[10], 建立了原生质体的电融合方法, 这种融合方法对原生质体毒性小, 融合频率高、迅速, 而且可以人为操纵融合过程, 因而近年来应用越来越广泛。^[3, 13]

番茄是一种重要的蔬菜作物, 利用细胞融合技术将野生番茄的抗逆性状转移到栽培种中具有重要意义。在本试验中, 我们利用电场融合技术成功地诱导了普通番茄叶肉原生质体和多毛番茄茎尖原生质体的高频率融合。

材 料 和 方 法

1. 试验材料

(1)原生质体分离 试验材料为普通番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill)品种“佛罗雷达(Floridel)”和多毛番茄(*Lycopersicon hirsutum* Humb.et Bonp)。将这二个种种植在生长箱中(25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 16小时光周期, 2300lx), 待生长4—6周, 取其顶端刚展开的幼叶, 在0.1%的HgCl₂中消毒3分钟, 然后用无菌水冲洗3次。用尖头镊子仔细地撕去下表皮, 然后漂浮在过滤灭菌的酶解液上。同时取约1cm长茎

尖,消毒后,撕去表皮,用解剖刀从中间剖成两半,然后转入酶解液中。分离原生质体的酶液组成为:0.5%纤维素酶 R-10 (Cellulase ONOZUKA R-10, Yault HONSHA Co., LTD, Japan), 0.1%离析酶 (macerozyme R-10 Yault HONSHA Co., LTD.), 5mM MES, 0.5%PVP, 10mg/l 水解乳蛋白, JSR 盐^[8], pH5.6。

(2)原生质体纯化 采用 Ficoll 密度梯度离心纯化原生质体^[2]。酶解约6小时后,原生质体和酶的混合液先通过 $0.68\mu\text{m}$ 孔径的不锈钢网,然后向过滤后除去大的残渣的原生质体和酶混合液中加入与其等量的30% Ficoll (JSR 盐, 0.3m蔗糖),充分混匀后,吸取6ml加入到10ml的离心管下部,在上面加一层12%的 Ficoll,再在12% Ficoll 上加约1ml含0.3m蔗糖的 JSR 盐。1000r/min 离心10分钟,轻轻摇动离心管,使漂浮于12% Ficoll 和 JSR 盐间的原生质体悬浮于顶层的 JSR 盐中。用 FDA 测定原生质体活力,用血球计数板计数原生质体数。

2. 方法

(1)PEG 诱导融合 将纯化和漂洗后的普通番茄叶肉原生质体和多毛番茄茎尖原生质体调整到 $1-5\times 10^5$ 原生质体/ml的密度,将5ml普通番茄叶肉原生质体悬浮液用离心沉淀法浓缩到约0.3ml,用 Ficoll 密度梯度离心法将5ml多毛番茄茎尖原生质体浓缩到0.3ml。两者混合后,加入30%PEG (mw.6000, 0.01mCaCl₂·2H₂O, 4%蔗糖),按常规方法诱导融合^[4,5]。

(2)电融合 采用 XR-1型细胞融合器(浙江医科大学生物医学工程系试制),并联一只 ARON-BS-601 示波器,对电场进行调节和监视。二平行电极间距为200 μm 。用来融合培养原生质体的融合小室为二块镀银的平行金属极板,板间距200 μm 。将普通番茄叶肉原生质体和多毛番茄茎尖原生质体,用 Ficoll 密度梯度离心法,分别转入0.5M的甘露醇溶液中,密度调整到 $1-5\times 10^5$ 原生质体/ml。在第一次实验中,用普通番茄叶肉原生质体作材料,试验电场条件。在随后的实验中,将二种原生质体按1:1的比例混合,滴加到融合小室的二电极间,然后在二电极间施加一高频电场,电压幅度维持在200V/cm,频率1mHz。在原生质体排列完成后,将电场强度下降到150V/cm,同时给一单次直流方波脉冲,电压幅度3kV/cm,脉宽40 μs 。以融合的原生质体数/原生质体总数表示融合频率。

(3)融合的原生质体培养 电融合处理的原生质体,用 JSR 盐漂洗3次后,再转入 JSCI2.5 培养基中,在24孔塑料细胞培养板中液体浅层培养,培养条件同前^[8]。

结 果

1. 原生质体的游离和纯化效果

在本试验的条件下,酶解6小时,即可从普通番茄和多毛番茄的叶片和茎尖游离大量有生活力的原生质体(图版I:1、2,表1),经 Ficoll 密度梯度离心纯化(图版I:3),可得到纯净的原生质体(图版I:4、5),特别是茎尖原生质体,比重小,用离心法难以沉淀,用 Ficoll 密度梯度离心很容易浓缩和收集(图版I:5)。

2. PEG诱导融合

PEG 诱导普通番茄叶肉原生质体和多毛番茄茎尖原生质体的总融合率为 11 ± 1.41 。

表 1 叶肉原生质体和茎尖原生质体的产量和活力

Table 1 Yield and viability of mesophyll and shoot tip protoplasts

	普通番茄 (<i>L. esculentum</i>)		多毛番茄 (<i>L. hirsutum</i>)	
	叶肉原生质体 Mesophyll protoplasts	茎尖原生质体 Shoot tip protoplasts	叶肉原生质体 Mesophyll protoplasts	茎尖原生质体 Shoot tip protoplasts
产量*(Yield)	4.34×10^7	0.18×10^7	2.44×10^7	0.28×10^7
活力(%) (Viability)	98.53	99.01	100	99.01

* No. of protoplasts/per gram fresh leaves

在融合处理的原生质体中,有2个原生质体融合形成的融合体,也有多个原生质体形成的融合体(图版 I: 6)。PEG 处理不影响原生质体的活力(图版 I: 7)。

3. 电融合

(1) 电介质电泳和膜接触 在二电极间滴加少许原生质体的甘露醇悬浮液,然后施加一交变电场,在显微镜下立即观察到原生质体发生双向电泳面向二极移动排列成串(图版 II: 1)。在电场强度为 100—350 V/cm 的范围内,原生质体排列速度随电场强度增加而增大。当电场强度高于 300 V/cm 时,部分原生质体拉长。电场强度超过 350 V/cm 时,原生质体发生崩解。合适的膜接触电压幅度为 200 V/cm 左右。原生质体密度对原生质体在电场中的排列也有影响,原生质体密度低时,细胞以 2—3 个排列的占多数,原生质体密度增加时,原生质体多排列成长串。维持适当的交变电场不变,原生质体的排列成串也维持不变。关闭交变电场,排列的原生质体重新分散。

(2) 原生质体融合 在原生质体排列成串后,在交变电场的持续作用下,附加单个方波脉冲信号引起原生质体接触部位膜的可逆击穿,排列的原生质体立即开始融合(图版 II: 2, 3, 4)。给予脉冲后 30 秒即可观察到原生质体融合完成,但大多数原生质体都在 2.5—10 分钟内完成融合。融合的原生质体多在 1—10 分钟内圆化。在本实验条件下,原生质体多为 2 个融合(图版 II: 2, 4),有的多个原生质体排列成串时,也是 2—3 个原生质体融合,融合体再相互融合(图版 II: 3)。普通番茄叶肉原生质体和多毛番茄茎尖原生质体的同源和异源融合都是随机的。单个方波脉冲的脉宽在 20—40 μ s 时,电压幅度在 100—500 V/cm 时无融合现象发生,电压幅度在 1000—3000 V/cm 时,融合率随电压幅度的上升而增加。电压幅度超过 5000 V/cm 时,原生质体发生解体。当电压幅度为 1000 V/cm 时,脉冲宽度为 40 μ s

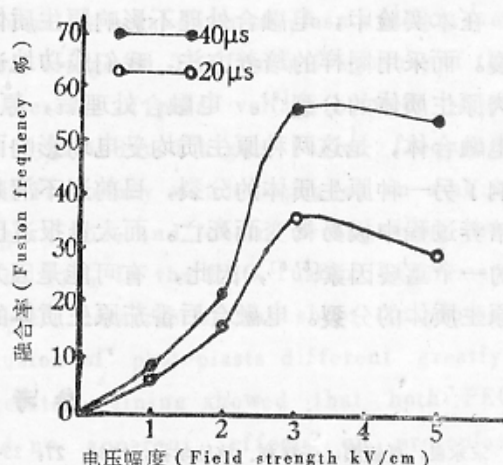


图 1 方波脉冲的电压幅度和脉宽对原生质体融合率的影响

Fig. 1 Effect of field strength and pulse duration of the square-wave pulse on protoplast fusion frequency

时原生质体的融合率比 $20\mu\text{s}$ 大(图1)。电压幅度在 $1000-3000\text{V}/\text{cm}$ 时,对于刺激融合较为合适,融合率最高可达 57%。电融合也不影响原生质体的活力。

4. 原生质体融合体的培养

电融合处理的原生质体在培养 4 天后仅观察到少数细胞发生第 1 次分裂(图版 II: 5, 6)。由于在培养过程中细胞形态的变化,不能判断这些细胞是否是融合体。

讨 论

PEG 诱导融合是植物原生质体融合的一种最广泛使用的技术,能有效地融合植物原生质体^[4-5]。与 PEG 融合相比,电融合可以大大提高融合频率^[1, 13]。在本实验中,电融合频率最高可达 57%,大大高于 PEG 融合的频率。普通番茄叶肉原生质体和多毛番茄茎尖原生质体的排列成串和融合是随机的,而且普通番茄叶肉原生质体比多毛番茄茎尖原生质体更易融合,这可能是因为这两种原生质体的膜的表面特性不同,因而对电融合刺激的敏感性不同所致^[1, 3],或是因为这两种原生质体的比重不同而造成的空间位置差异所致。因此,要提高异源二核体的比例,还需进一步研究这两种原生质体融合的适宜的电场参数,或者在电融合处理后,采用适当的选择系统收集异源二核体^[7]。

通过控制脉冲的电压幅度和脉宽,可使外源物资颗粒透过质膜进入细胞中^[1, 11, 12]。因而,有人设想用电穿孔的方法将特定的质粒 DNA 整合到原生质体中^[12],或把脂质体和细菌的球形原生质体与植物原生质体融合^[11]。在我们的实验中,也未观察到原生质体大小对融合率的明显影响^[6, 11],大小差异很大的叶肉原生质体和茎尖原生质体能有效地融合。从而初步证实通过电穿孔的方法转移外源遗传物质进入原生质体可能是有效的^[1, 11, 12]。当然,这还需要进一步研究电场参数。

在本实验中,电融合处理不影响原生质体的活力。但仅观察到了少数细胞的第一次分裂。而采用同样的培养方法,我们成功地诱导了未经融合处理的普通番茄和多毛番茄叶肉原生质体的分裂^[8]。电融合处理后,原生质体群体中存在未融合的亲本原生质体和电融合体,是这两种原生质均受电场影响而难启动分裂,还是电刺激后一种原生质体影响了另一种原生质体的分裂,目前还不清楚。我们曾观察到电融合后的多细胞融合体在培养过程中极易褐变而死亡。而大量报道已证实,褐变是番茄原生质体培养体影响分裂的一个重要因素^[8, 9],因此,有可能是因为一些多细胞融合体的褐变影响了融合处理的原生质体的分裂。电融合后番茄原生质体的培养还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 宋永根,夏镇澳,张林祥.植物学报,1985; 27: 33-38
- 2 Attree S M, Sheffield E. Plant Cell Rep, 1986; 165: 217-224
- 3 Bate G W. Planta, 1985; 165: 217-224
- 4 Kao K N, Michayluk M R. Planta, 1974; 115: 355-367
- 5 Kao K N. Plant protoplast fusion and somatic hybrids. In: Plant Tissue Culture. The Pitman Int Ser Appl Biol Proc. Beijing Symp., Han H(ed) Pitman, London, 1981; 331-339
- 6 Kartha K K, Gamborg O L, Constabel F, Kao K N. Can J Bot, 1974; 52: 2435-2436
- 7 Kamata Y, Nagata J. Theor Appl Genet, 1987; 75: 26-29
- 8 Liu Ke-Bin, Li Shu-Xuan. Plantlet regeneration from mesophyll protoplasts of tomato (Lycopersicon esculentum L.).

- persicon esculentum* Mill), Appl Biotechno Agric, Shanghai Sci Techno Publishers, 1988; 92—99
- 9 O'Connell M A, Hanson M R. Theor Appl Genet, 1985; 70: 1—12
- 10 Senda M, Takada J, Abe S, Nakamura T. Plant Cell Physiol, 1979; 20: 1441—1443
- 11 Tempelaar M J, Jones M G K. Planta, 1985; 165: 205—216
- 12 Zimmermann U. Biochem Biophys Acta, 1982; 694: 227—277
- 13 Zimmermann U, Scheurich P. Planta, 1981; 151: 26—32

ELECTROFUSION BETWEEN MESOPHYLL PROTOPLASTS OF LYCOPERSICON ESCULENTUM AND SHOOT TIP PROTOPLASTS OF LYCOPERSICON HIRSUTUM

Liu Kebin, Li Shuxuan (Lee Shu-Hsien)

(Department of Horticulture, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Yu Hai, Hu Xun, Guo Yishu

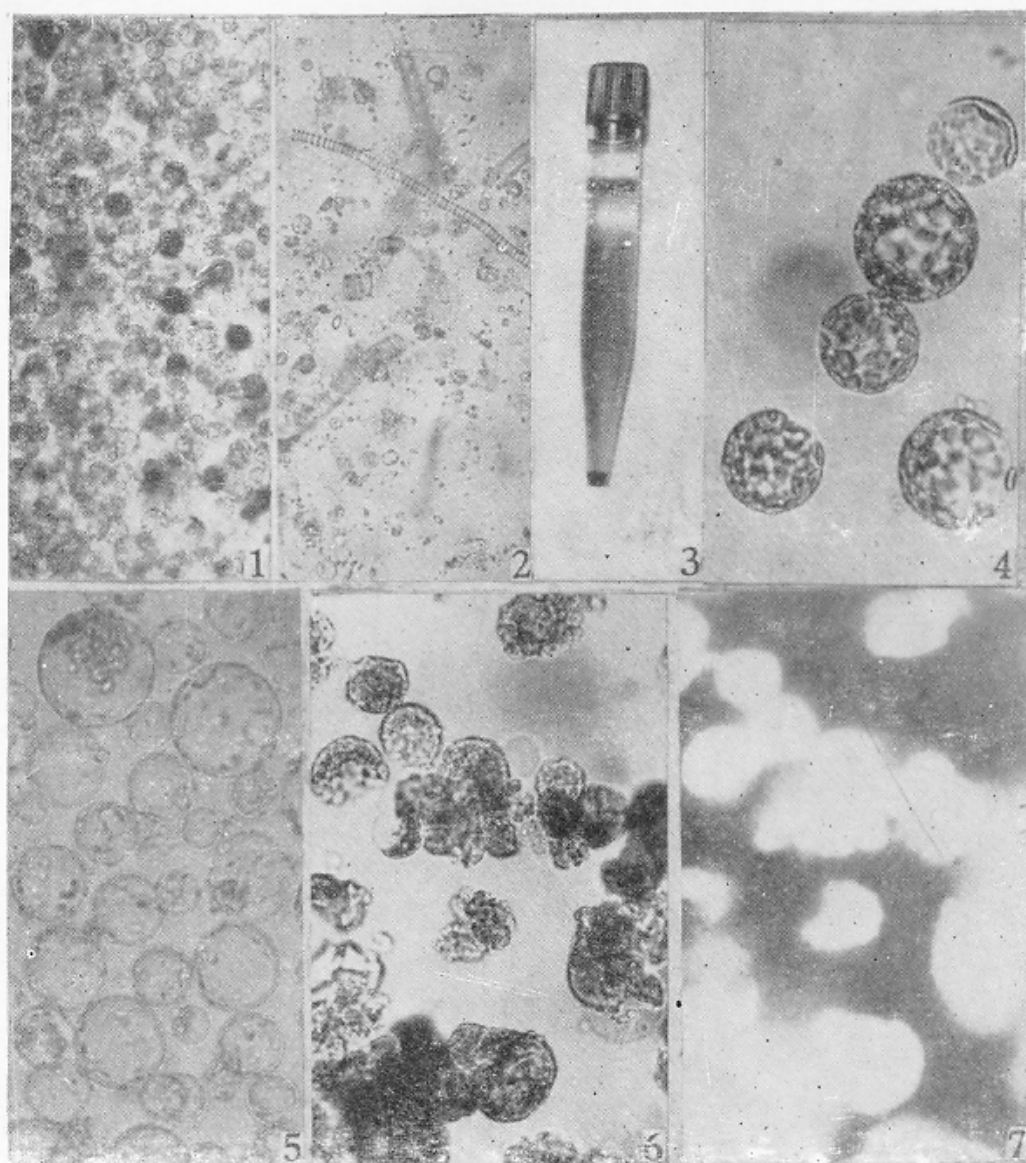
(Cancer Institute, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031)

Abstract Mesophyll protoplasts and shoot tip protoplasts of *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum* were enzymatically isolated, and the electrofusion experiments with mesophyll protoplasts of *L. esculentum* and shoot tip protoplasts of *L. hirsutum* were carried out.

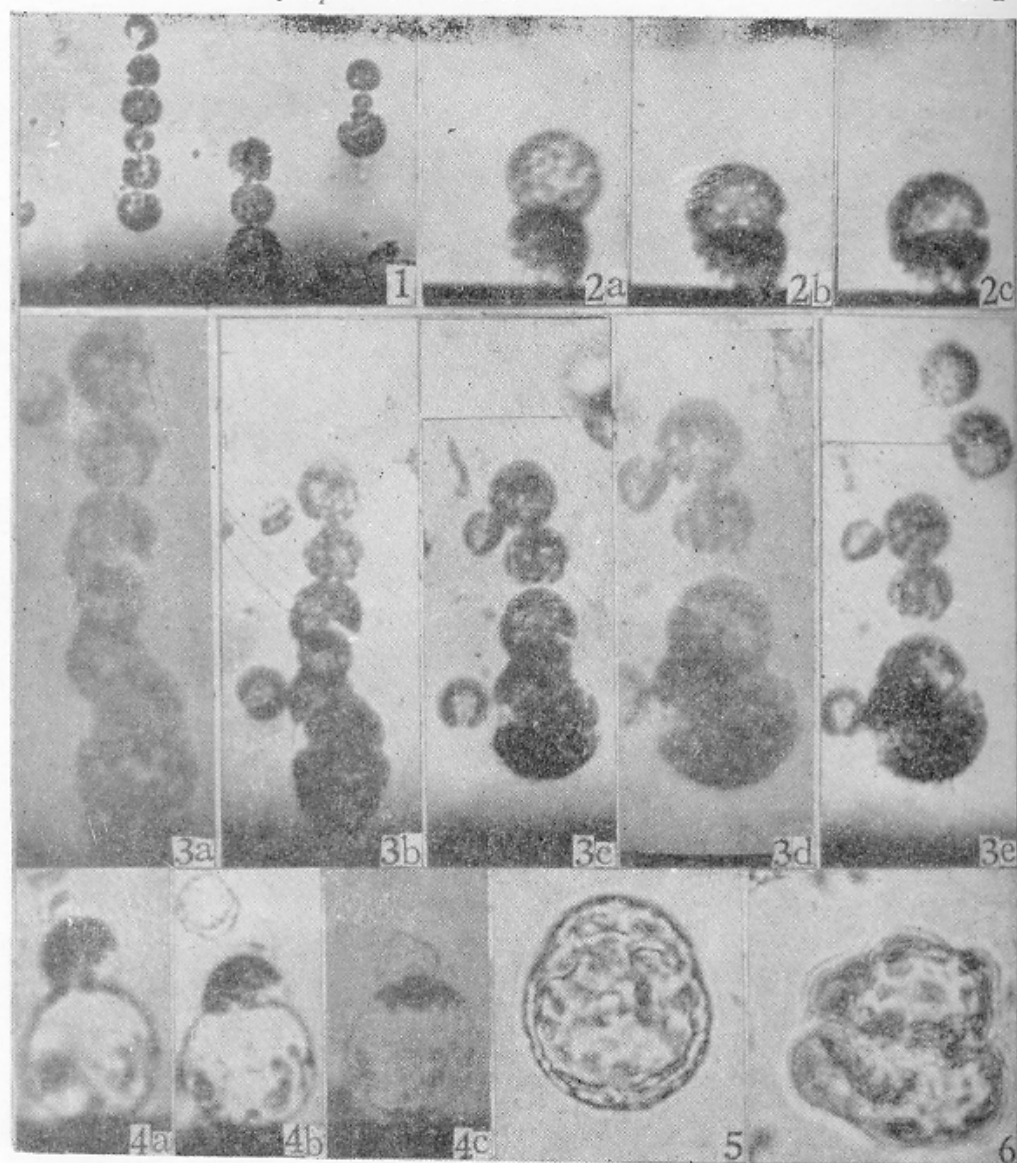
Applying a high-frequency alternating electrical field (sine wave, 1mHz, 200V/cm) generated from a self-made cell fusion apparatus, protoplasts were aligned between two parallel electrodes (200 μ m in distance) by dielectrophoresis. This chain arrangement of the protoplasts could be manipulated by regulating the electrical parameters and protoplast density. After supplement with a single square wave pulse, the reversible breakdown of plasma membranes was induced and then protoplast fusion was triggered. The fusion frequency of the aligned protoplasts increased with the increase of pulse voltage between 1000—3000V/cm, and the pulse duration of 40 μ s induced higher fusion frequency than that of 20 μ s. The maximal fusion frequency which depended on a number of factors including protoplast origin, size and chain arrangement was 57% in this experiment, compared with 11% in the PEG fusion experiment here. Mesophyll protoplasts tended to fused more easily than shoot tip protoplasts, but no obvious limitation for fusion of protoplasts different greatly in size was observed. Fluorescein diacetate staining showed that both PEG induced fusion and electrofusion had no apparent effects on protoplast viability.

The electrofusion-treated protoplasts were capable of cell wall formation and cell division when cultured in liquid medium, but no constant cell growth.

Key words Tomato; Protoplast; Electrofusion



1. 刚分离的普通番茄叶肉原生质体。×75 2. 刚分离的多毛番茄茎尖原生质体。×50
3. Ficoll 密度梯度离心纯化原生质体。4. 纯化后的普通番茄叶肉原生质体。×500 5. 纯化后的多毛番茄茎尖原生质体。×300 6. PEG诱导融合的原生质体。×250 7. 同6, FDA染色, 荧光显微镜拍照。×250
1. freshly isolated mesophyll protoplasts of common tomato. ×75 2. freshly isolated shoot tip protoplasts of *L. hirsutum*. ×50 3. Purification of protoplasts by Ficoll density gradient centrifugation. 4. purified mesophyll protoplasts of common tomato. ×500
5. Purified shoot tip protoplasts of *L. hirsutum*. ×300 6. protoplasts fusion induced by PEG. ×250 7. the same as in fig. 6, FDA staining and fluorescein microscope observation. ×250



1. 普通番茄叶肉原生质体在二电极间排列成串。×150
 2. 两个普通番茄叶肉原生质体融合过程。a、b、c 分别为附加脉冲后40秒、3分钟和6分钟。×400
 3. 多个普通番茄叶肉原生质体融合过程。a、b、c、d、e 分别为附加脉冲后40秒、1.5分钟、3分钟、4.5分钟、5分钟。×400
 4. 普通番茄叶肉原生质体和多毛番茄茎尖原生质体的融合过程。a、b、c 分别为附加脉冲后0秒、4.5分钟和10分钟。×400
 5. 培养4天，细胞开始分裂。×800
 6. 培养4天，第一次细胞分裂。×800
1. aligned mesophyll protoplasts between two electrodes. ×150
2. fusion process of two mesophyll protoplasts of common tomato. a, b, c, 40 seconds, 3 minutes, 6 minutes respectively after addition of pulse. ×400
3. fusion process of several protoplasts. a, b, c, d, e, 40 seconds, 1.5 minutes, 3 minutes, 4.5 minutes and 5 minutes respectively after addition of pulse. ×400
4. fusion process of common tomato mesophyll protoplasts and *L. hirsutum* shoot tip protoplasts. a, b, c, 0, 4.5 minutes and 10 minutes respectively after addition of pulse. ×400
5. Four day in culture, cell tended to divide. ×800
6. four day in culture, cell division. ×800